



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A01K 67/027, G01N 33/50, 33/15, A61K 45/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/10382</p> <p>(43) 国際公開日 2000年3月2日(02.03.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04439</p> <p>(22) 国際出願日 1999年8月18日(18.08.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/232817 1998年8月19日(19.08.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 吉原良浩(YOSHIHARA, Yoshihiro)[JP/JP] 〒533-0012 大阪府大阪市東淀川区大道南一丁目17-37-501 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門第5森ビル3階 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: MODEL ANIMAL WITH VISUALIZED NERVE NETWORK</p> <p>(54)発明の名称 神経回路網可視化モデル動物</p> <p>(57) Abstract A transgenic animal into which a transsynaptic tracer protein gene has been transferred so that it can be expressed specifically in specific nerve cells. Use of this transgenic animal makes it possible to selectively visualize a functional nerve network from neurons of a specific type, which is impossible by the tracing method with the use of the conventional transsynaptic tracer proteins.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

(57)要約

経シナプス性トレーサータンパク質の遺伝子が特定の神経細胞に特異的に発現するように導入されているトランスジェニック動物を提供する。このトランスジェニック動物を用いることにより、従来の経シナプス性トレーサータンパク質を用いたトレーシングでは不可能であった特定のタイプのニューロン群からの機能的神経回路網の選択的可視化することができるようになる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レント	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサウ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア		TR トルコ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	ML マリ	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	MN モンゴル	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MW マラウイ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	VN ヴイエトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	YU ユーゴスラビア
CU キューバ	JP 日本	NO ノルウェー	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュージーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

明細書

神経回路網可視化モデル動物

発明の属する技術分野

本発明は、経シナプス性トレーサタンパク質をコードする遺伝子が特定の神経細胞に特異的に発現するように導入されているトランスジェニック動物、それを用いた神経作用物質のスクリーニング方法、及びそのスクリーニング方法によって得ることができる神経作用物質に関するものである。

従来技術

学習・記憶、各種感覚情報の認識と統合、運動の発現・調節、さらには情動など様々な機能を有する脳は、複雑であるが秩序だった神経回路網を基本として成り立っている。そのような脳の構造および機能を研究するためには、神経回路網の形成・維持・可塑性の分子機構を知ることが必要である。特にニューロンがどのように軸索を正しい方向へと伸長し、標的細胞を認識し、シナプスを形成し、神経回路をつくり、それを維持し、さらには必要に応じてそれを可塑的に変化させるか、という問題を解決することがこれらの神経科学の様々な領域における研究で試金石となることに疑いの余地はない。

古くから神経解剖学においてニューロン間の連絡様式を研究する目的で、様々な植物レクチンが経シナプス性トレーサーとして利用されてきた。特に小麦胚芽レクチン (wheat germ agglutinin、以下「WGA」と略記する) は最も効率よく一次ニューロンから二次ニューロンへとシナプスを介して輸送され、神経系のあらゆるシステムにおいてその力を発揮してきた。例えば視覚系において、片眼にWGAを注入すると網膜神経節細胞に取り込まれ、視神経から視床の外側膝状体へと運ばれ、そこで経シナプス性に視床二次ニューロンへと輸送され、その終末部である大脳皮質視覚野がラベルされる。このようにして眼優位性カラム構造 (ocular dominance column) を可視化することができる。このようにWGAをトレーサーとした技術は非常に有効かつ強力であり、神経科学において大きな発展

をもたらしていた。

しかしながら、これまでの WGA を用いたトレーシングでは、注入部位近傍のすべての細胞への WGA 取り込みが起こり、特定のタイプのニューロン群からの機能的神経回路網を選択的に観察することは不可能であった。また、WGA 注入を受けた動物がそれを異物として認識し、重篤な免疫反応を起こすなどの問題点が指摘されてきた。

発明が解決しようとする課題

WGA を用いたトレーシング法はニューロン間の連絡様式を研究する上で非常に有効なものであるが、上述したような様々な問題点を抱えている。本発明は、このような問題点を解決することをその目的とするものである。

課題を解決するための手段

本発明者は、上記課題を解決するための鋭意検討を重ねた結果、経シナプス性トレーサータンパク質の遺伝子を特定の神経細胞に特異的に発現するように導入したトランスジェニック動物を使用することにより上述した問題を解決できることを見だし、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、経シナプス性トレーサータンパク質の遺伝子が特定の神経細胞に特異的に発現するように導入されていることを特徴とするトランスジェニック動物である。

また、本発明は、上記のトランスジェニック動物に被検物質を投与し、該トランスジェニック動物の神経細胞における経シナプス性トレーサータンパク質を指標として、被検物質の中から神経作用物質を選択することを特徴とする神経作用物質のスクリーニング方法である。

さらに、本発明は、上記のスクリーニング方法によって得ることができる神経作用物質である。

なお、本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願（特願平 10-232817 号）の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

発明の開示

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のトランスジェニック動物は、経シナプス性トレーサータンパク質が特定の神経細胞に特異的に発現するように導入されていることを特徴とするものである。

経シナプス性トレーサータンパク質の例としては、前述の WGA の他に ConA (Concanavalin A agglutinin)、PSA (Pisum Sativum agglutinin)、LCA (Lens Culinaris agglutinin) などが挙げられるが、その他の経シナプス性トレーサータンパク質でもかまわない。経シナプス性トレーサータンパク質の遺伝子を特定の神経細胞に特異的に発現させることは、前記遺伝子上流に特定の神経細胞に特異的に機能するプロモーターを配置することによりなし得るが、この手段に限定されるわけではない。特定の神経細胞に特異的に機能するプロモーターとしては、小脳プルキンエ細胞に特異的に機能する L7 プロモーター、嗅細胞に特異的に機能する OMP プロモーターなどを例示できるが、これらに限定されるわけではない。なお、本発明のトランスジェニック動物における「特異的」の意味は、必ずしも特定の神経細胞以外では経シナプス性トレーサータンパク質の遺伝子が全く発現しないということではなく、経シナプス性トレーサータンパク質を酵素標識抗体等で可視化した際に、特定の神経細胞と他の細胞とを識別できる程度に経シナプス性トレーサータンパク質の発現量に差異があるという意味である。

経シナプス性トレーサータンパク質の遺伝子は、野性型の遺伝子をそのまま使用してもよいが、WGA 遺伝子の場合には、後述する理由から C 末端プロペプチドをコードする部分を切り落としたものを使用するのが好ましい。

対象とする動物の種類は、神経網を有する動物であれば特に限定されない。

本発明のトランスジェニック動物は、例えば、以下のようにして作製することができる。特定の神経細胞に特異的に機能するプロモーターを含む断片と経シナプス性トレーサータンパク質の遺伝子を含む断片とを PCR によりそれぞれ増幅し、これらの増幅断片を既存ベクターに挿入する。この組換えベクターを対象とする動物の受精卵又は胚に注入し、得られる動物の中から経シナプス性トレーサータンパク質の遺伝子を有するものを選抜する。特定の神経細胞に特異的に機能する

プロモーターを含む断片は、例えば、L7 プロモーターの場合、配列番号 2 に示す塩基配列の開始コドンより上流の領域を増幅できるようなプライマーを作製し、マウスのゲノム DNA を鋳型として PCR を行うことによりプロモーター領域の一部を増幅し、さらに増幅した PCR 産物をプローブとして、マウスのゲノム DNA のライブラリー（例えば市販のものであれば Stratagene 社の mouse Genomic DNA Library SC945301 など）より得られ、OMP プロモーターの場合、配列番号 3 に示す塩基配列の開始コドンより上流の領域を増幅できるようなプライマーを作製し、マウスのゲノム DNA を鋳型として PCR を行うことにより得られる。経シナプス性トレーサータンパク質の遺伝子を含む断片は、例えば、WGA 遺伝子の場合、配列番号 1 に示す塩基配列のコーティング領域を増幅できるようなプライマーを作製し、小麦胚芽の cDNA を鋳型として PCR を行うことにより得られる。

本発明のトランスジェニック動物は、各種神経性疾患の原因解明や治療手段の確立などに有用である。例えば、神経回路異常に起因する疾患のモデル動物、あるいは自然発症変異動物と本発明のトランスジェニック動物とを交配し、得られる動物を用いて当該疾患の原因となる神経回路の異常や当該疾患に起因する代償性回路を解析することができる。また本発明のトランスジェニック動物を用いて、パーキンソン病、虚血、頭部外傷あるいは各種精神疾患の病態モデルを人為的に作製し、これを用いて損傷された回路や代償性回路を解析することができる。さらに、病態を呈する本発明のトランスジェニック動物に各種薬剤を投与し、可視化された経シナプス性トレーサータンパク質を指標として投与した薬剤の効果、即ち、損傷された回路の回復、代償性回路の形成能を評価することができる。

また、本発明のトランスジェニック動物の経シナプス性トレーサータンパク質の発現組織から初代培養を行い、経シナプス性トレーサータンパク質を発現する培養神経細胞系を作製し、この培養神経細胞を用いて、細胞の生存維持、突起伸展、シナプス形成、各種酵素活性や神経伝達物質産生等に影響を及ぼす薬剤のスクリーニングを行うことができる。

本発明の神経作用物質は、上記のスクリーニング方法を用いて被検物質、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、微生物発酵生産物、海洋生物抽出液、植物抽出液、細胞抽出液、動物組織抽出液をスクリーニン

グすることにより得ることができる。これらの被検物質は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

以下に実施例を示して本発明をより詳細に説明するが、本発明の範囲を限定するものではない。

実施例

〔実施例 1〕 WGA を発現するベクターの作製

pWGA-D (Smith, J. J. & Raikhel, N. V. Plant Mol. Biol. 13, 601-603(1989)) から切り出した野生型の WGA cDNA (1.0kb) の末端を平滑化した後、BstXI 部位を付加した。これを哺乳動物発現ベクター pEF-BOS (Mizushima, S. & Nagata, S., Nucl. Acids Res. 18, 5322(1990)) の BstXI 部位にサブクローニングして、プラスミド pEF-WGA を作製した。このプラスミドでマウス神経芽細胞腫 N2a 細胞を、リポフェクタミン (Lipofectamine) と Opti-MEM (Gibco/BRL) を使用してトランスフェクションした。トランスフェクションから 48 時間後、抗 WGA 抗体を用いたウエスタン・ブロッティングにより WGA の発現の有無を調べた。図 2 に示すように WGA は検出されたが (レーン 2、分子量 24kD)、そのサイズは本物の WGA (真正 WGA) (レーン 4、分子量 18kD) よりかなり大きかった。

この現象は、植物の WGA には、液胞へのレクチンの選択的送達に関与すると考えられている C 末端プロペプチド (アミノ酸残基 15) を有していることから (Broadwell, R. D. & Balin, B. J., J. Comp. Neurol. 242, 632-650(1985))、分子量の差は動物細胞中にそのような C 末端プロペプチドを切断する機構が存在しないことに起因するものと推測された。そこで、プロペプチド切断部位が切り落とされた切断 WGA をコードする DNA を含むプラスミドを作製することにした。

プラスミド pEF-WGA を鋳型とし、完全に相補的でないプライマーを使用して PCR を行い、野生型 WGA をコードする DNA (図 1 (1)) のコドン GTC (バリン 198) をオパール終止コドン TGA に置き換えた切断 WGA をコードする cDNA (図 1 (2)) を含むプラスミド pEF-tWGA を作製した。このプラスミド pEF-tWGA で N2a 細胞をトランスフェクションし、発現タンパク質をウエスタン・ブロッティングにより解析したところ、真正 WGA と同サイズの WGA が検出された (図 2 レーン 3)。

また、産生した WGA の量も野性型の WGA よりもはるかに多かった。以上のことから以後の実験ではすべてこの切断 WGA をコードする DNA を使用することにした。

pEF-tWGA でトランスフェクションした N2a 細胞を抗 WGA ポリクローナル抗体と Cy3 抗ウサギ抗体 IgG (Jackson) ($10\mu\text{g/ml}$, Sigma) で処理した後、Zeiss Axiophot F1 顕微鏡を備えた共焦点レーザー走査型顕微鏡システム (Bio-Rad MRC-600) で観察した (図 3)。図 3 に示すように、WGA は N2a 細胞の細胞内顆粒様構造に強く結合していた。

〔実施例 2〕 pL7-tWGA 導入マウスの作製

Pcp2-z06 プラスミド (Vandaele, S. et al., Genes Dev. 5, 1136-1148(1991)) からマウス L7 プロモーター領域 (3.5kb) を増幅した。L7 (Pcp2) 遺伝子プロモーターは、詳細に解析されており (Oberdick, J. et al., Neuron 1, 367-376(1988), Oberdick, J. et al., Science 248, 223-226(1990), Oberdick, J. et al., Neuron 10, 1007-1018(1993), Vandaele, S. et al., Genes Dev. 5, 1136-1148(1991)), 外来遺伝子を小脳プルキンエ細胞に特異的に発現させるために使用されている (Feddersen, R.M. et al., Neuron 9, 955-966(1992), Burright, E.N. et al. Cell 82, 937-948(1995))。この増幅断片を pBstN ベクター (ヒト b-グロビン遺伝子のイントロンと SV40 ポリアデニル化シグナルを含有する) の平滑末端化した BamHI 部位にサブクローニングした後、このプラスミドの平滑末端化した EcoRI 部位に、pEF-tWGA から切り出した tWGA cDNA 配列 (0.6kb) を連結し、小脳プルキンエ細胞に特異的に WGA を発現させるプラスミド pL7-tWGA を作製した (図 1 (3))。

精製した pL7-tWGA をマウスの FVB/N (CLEA Japan) 系から採取した受精卵の雄性前核に注入した。pL7-tWGA の受精卵への注入は主に Nohmi, T. et al., Environment. Mol. Mutagenesis 28, 465-470(1996) に従った。pL7-tWGA を注入した卵を培養し、ICR (CLEA Japan) 擬妊娠レシピエントの卵管中に移した。テイル DNA の PCR とサザン解析により、導入遺伝子の組み込みをスクリーニングし、導入遺伝子の完全長を有するトランスジェニックマウスを得た。

このトランスジェニックマウスの脳における WGA mRNA 及び WGA タンパク質の存在部位を、それぞれ in situ ハイブリダイゼーション及び酵素標識抗体を用い

た染色法により調べた。

in situ ハイブリダイゼーションは、Yoshihara, Y. et al., J. Neurosci. 17, 5830-5842(1997) に従い、以下のように行った。

パラホルムアルデヒドで灌流した成体マウスの脳の切片 ($50\mu\text{m}$) を、プロテイナーゼ K ($10\mu\text{g/ml}$ 、 25°C で 30 分) で処理し、アセチル化した後脱水し、次いで空気乾燥した。 ^{35}S -UTP (Amersham) と RNA 転写キット (Stratagene) で WGA のアンチセンスリボプローブ (長さ 540 ヌクレオチド) を調製した。切片を、加湿チャンバー中で 1×10^6 cpm/ml の上記プローブとともに 56°C で一晩ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、切片を $4 \times \text{SSC}$ で洗浄し、RNase A ($10\mu\text{g/ml}$ 、 37°C で 30 分) で処理し、 $0.05 \times \text{SSC}$ で洗浄し、エタノールで脱水し、 β max X 線フィルム (Amersham) に暴露した。

また、酵素標識抗体を用いた染色法は、以下のように行った。

パラホルムアルデヒドで灌流したマウスの脳の切片 ($50\mu\text{m}$) を、スライド式ミクロトームで作製し、 0.3% 過酸化水素で前処理し、ブロッキングし、そして抗 WGA ポリクローナル抗体 ($3\mu\text{g/ml}$ 、Sigma) (あらかじめ、マウス脳の 1% アセトン粉末で吸収した) と室温で 2~24 時間インキュベートした。次に切片を、ビオチン抗ウサギ IgG (Zymed) 次にベクタスタイン (Vectastain) ABC エリートキット (Vector) とインキュベートするか、または西洋ワサビペルオキシダーゼ抗ウサギ IgG (Jackson) とインキュベートした。シグナルを、 Ni^{2+} で強化したジアミノベンジジン/ペルオキシド反応で視覚化した。標識切片を透過型顕微鏡システムで解析した。

脳組織全体の切片における WGA mRNA の検出部位を図 4 (1) に、前記切片に隣接する切片における WGA タンパク質の検出部位を図 4 (2) にそれぞれ示す。これらの図が示すように、WGA mRNA はプルキンエ細胞にのみ検出されたが、WGA タンパク質はプルキンエ細胞のみならず、プルキンエ細胞と構造的及び機能的に関係のある他の細胞においても検出された。また、図 5 に小脳部分を含む切片における WGA タンパク質の検出部位を示す。この図が示すように、WGA タンパク質は、プルキンエ細胞以外には、小脳核 (歯状核、室頂核、挿入核) 及び前庭神経核で検出された。

プルキンエ細胞の軸索は、小脳核とシナプスを形成しており、また、小脳核の軸索は前庭神経核とシナプスを形成している(Ito, M., The cerebellum and neural control. (New York: Raven Press)(1984), Altman, J. & Bayer, S.A., Development of the cerebellar system: in relation to its evolution, structure, and functions. (Boca Raton, Florida: CRC Press)(1996)))。一部のプルキンエ細胞は直接前庭神経核へと投射しているので前庭神経核には二次ニューロンも存在している。以上の点を考慮すると、WGA はプルキンエ細胞の二次ニューロン及び三次ニューロンにまで運搬されたものと考えられる。

pL7-tWGA で形質転換したトランスジェニックマウスの小脳におけるプルキンエ細胞と WGA タンパク質の存在部位を二重免疫蛍光標識法により調べた。プルキンエ細胞は、抗カルビジン抗体 (Sigma) と FITC 抗マウス IgG (Cappel) により検出し (カルビジンはプルキンエ細胞に特異的に存在する)、WGA タンパク質は、抗 WGA 抗体と Cy3 抗ウサギ IgG (Jackson) によりそれぞれ検出した。プルキンエ細胞の検出部位を図 6 (1) に、WGA タンパク質の検出部位を図 6 (2) に、両者の検出部位を図 6 (3) にそれぞれ示す。これらの図が示すように、プルキンエ細胞軸索末端から小脳核の神経細胞への WGA タンパク質の経シナプ斯的移動が観察された。

pL7-tWGA で形質転換したトランスジェニックマウスの小脳以外の脳における WGA タンパク質の存在部位を酵素標識抗体を用いた染色法により調べた。視床腹外側核を含む切片における WGA タンパク質の検出部位を図 7 (1) に、赤核を含む切片における WGA タンパク質の検出部位を図 7 (2) に、図 7 (1) の拡大像を図 7 (3) に、図 7 (2) の拡大像を図 7 (4) に、上丘を含む切片における WGA タンパク質の検出部位を図 7 (5) に、巨大細胞性網様核を含む切片における WGA タンパク質の検出部位を図 7 (6) に、前庭神経核を含む切片における WGA タンパク質の検出部位を図 7 (7) に、下オリーブ核を含む切片における WGA タンパク質の検出部位を図 7 (8) にそれぞれ示す。これらの図が示すように、視床腹外側核、赤核、上丘、巨大細胞性網様核、前庭神経核、下オリーブ核のいずれにおいても WGA タンパク質が検出された。これらの神経細胞はいずれも小脳核の軸索とシナプスを形成するものであり、プルキンエ細胞の三次ニューロンにあたる。

〔実施例 3〕 pOMP-tWGA 導入マウスの作製

マウスゲノム DNA から OMP プロモーター領域(Buiakova, O.I. et al., Genomics, 20, 452-462(1994)) を PCR (0.9kb) で増幅し、これを pBstN ベクターの平滑末端化した BamHI 部位にサブクローニングした(図 1(4))。OMP プロモーター領域の下流に tWGA cDNA を挿入し、pOMP-tWGA を得た。この pOMP-tWGA を用いて実施例 2 と同様にトランスジェニックマウスを作製した。

上記のトランスジェニックマウスの鋤鼻器官における WGA タンパク質の存在部位を、免疫蛍光標識法により調べた。免疫蛍光標識法は、抗 WGA 抗体及び Cy3 抗ウサギ IgG を使用して行った。鋤鼻器官を含む切片における WGA タンパク質の検出部位を図 9(1) に、その拡大像を図 9(2) にそれぞれ示す。これらの図が示すように、WGA タンパク質は、鋤鼻上皮及び鋤鼻神経束において多量に検出された。

pOMP-tWGA で形質転換したトランスジェニックマウスの鋤鼻器官における軸索と WGA タンパク質の存在部位を二重免疫蛍光標識法により調べた。軸索は、抗 NCAM 抗体と FITC 抗マウス IgG (Cappel) により検出し (NCAM は軸索に特異的に存在する)、WGA タンパク質 は、抗 WGA 抗体と Cy3 抗ウサギ IgG (Jackson) によりそれぞれ検出した。WGA タンパク質の検出部位を図 10(1) に、軸索の検出部位を図 10(2) に、両者の存在部位を図 10(3) にそれぞれ示す。これらの図が示すように、NCAM は嗅覚神経及び鋤鼻神経中で均等に検出されたが、WGA タンパク質は鋤鼻神経中で特に多量に検出された。

pOMP-tWGA で形質転換したトランスジェニックマウスの脳における WGA タンパク質の存在部位を酵素標識抗体を用いた染色法により調べた。

図 11 は脳全体を含む切片における WGA タンパク質の検出部位を示す。この図が示すように、副嗅球に多量の WGA タンパク質が検出された。

図 12(1) 及び図 12(2) は副嗅球を含む切片における WGA タンパク質の検出部位を示す。これらの図が示すように、WGA タンパク質は糸球体中の鋤鼻軸索末端のみならず、外部網状層や顆粒細胞層でも検出された。

図 13(1)、図 13(2)、及び図 13(3) は外側嗅索を含む切片における WGA タンパク質の検出部位を示す。これらの図が示すように、鋤鼻細胞の二次ニューロンである外側嗅軸中の僧帽/房飾細胞軸索においても WGA タンパク質が検出され

た。

図 1 4 (1) 及び図 1 4 (4) は内扁桃核を含む切片、図 1 4 (2) は後皮質扁桃核を含む切片、図 1 4 (3) は分界条の核床を含む切片における WGA タンパク質の検出部位をそれぞれ示す。これらの図が示すように、鋤鼻細胞の三次ニューロンである内扁桃核、後皮質扁桃核、分界条の核床のいずれにおいても WGA タンパク質が検出された。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

発明の効果

本発明は、従来の経シナプス性トレーサータンパク質を用いたトレーシングでは不可能であった特定のタイプのニューロン群からの機能的神経回路網の選択的可視化を可能にする。また、従来の経シナプス性トレーサータンパク質を用いたトレーシングでは、動物に経シナプス性トレーサータンパク質を注入するため注入技術に起因する個体間のばらつきや重篤な免疫反応が生じるといった問題があったが、本発明ではそのような問題は生じない。

図面の簡単な説明

図 1 : WGA 遺伝子の構造を示す図である。

図 2 : WGA 遺伝子の発現産物のウェスタン・ブロッティングの結果を示す写真である (電気泳動写真)。

図 3 : N2a 細胞中の WGA タンパク質の存在部位を示す写真である (顕微鏡写真)。

図 4 : 脳切片における WGA mRNA と WGA タンパク質の存在部位を示す写真である (顕微鏡写真)。

図 5 : 小脳を含む切片における WGA タンパク質の存在部位を示す写真である (顕微鏡写真)。

図 6 : プルキンエ細胞と WGA タンパク質の存在部位を示す写真である (顕微鏡写真)。

図 7 : 各種脳切片における WGA タンパク質の存在部位を示す写真である (顕微鏡

写真)。

図 8 : プルキンエ細胞を含む神経網の経路を示す略図である。

図 9 : 鋤鼻器官を含む切片における WGA タンパク質の存在部位を示す写真である (顕微鏡写真)。

図 10 : 鋤鼻器官軸索を含む切片における軸索と WGA タンパク質の存在部位を示す写真である (顕微鏡写真)。

図 11 : 脳切片における WGA タンパク質の存在部位を示す写真である (顕微鏡写真)。

図 12 : 副嗅球を含む切片における WGA タンパク質の存在部位を示す写真である (顕微鏡写真)。

図 13 : 外側嗅索を含む切片における WGA タンパク質の存在部位を示す写真である (顕微鏡写真)。

図 14 : 内扁桃核を含む切片における WGA タンパク質の存在部位を示す写真である (顕微鏡写真)。

図 15 : 嗅細胞を含む神経網の経路を示す略図である。

請求の範囲

1. 経シナプス性トレーサタンパク質の遺伝子が特定の神経細胞に特異的に発現するように導入されていることを特徴とするトランスジェニック動物。
2. 経シナプス性トレーサタンパク質の遺伝子の upstream に特定の神経細胞に特異的に機能するプロモーターが配置されていることを特徴とする請求項 1 記載のトランスジェニック動物。
3. 経シナプス性トレーサタンパク質が、小麦胚芽レクチンであることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のトランスジェニック動物。
4. 請求項 1、2 又は 3 記載のトランスジェニック動物に被検物質を投与し、該トランスジェニック動物の神経細胞における経シナプス性トレーサタンパク質を指標として、被検物質の中から神経作用物質を選択することを特徴とする神経作用物質のスクリーニング方法。
5. 請求項 4 記載のスクリーニング方法によって得ることができる神経作用物質。

図 1

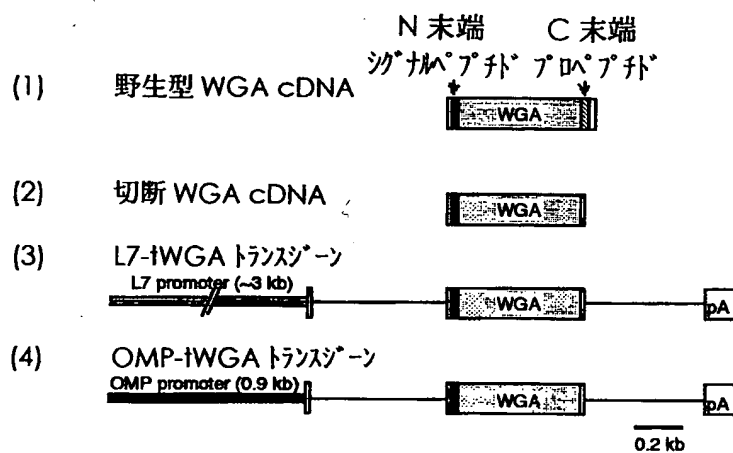


図 2

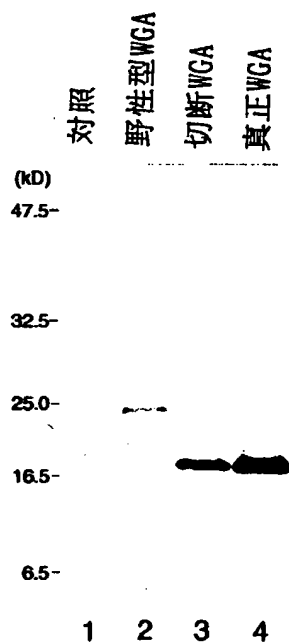


図 3

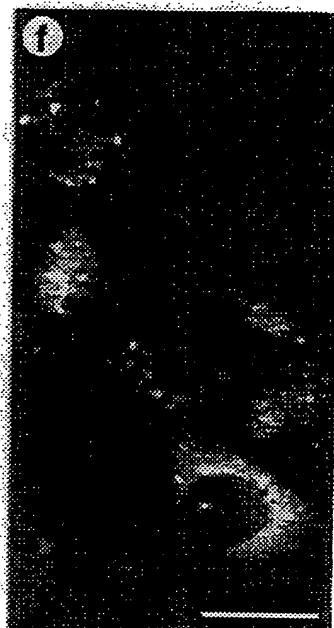
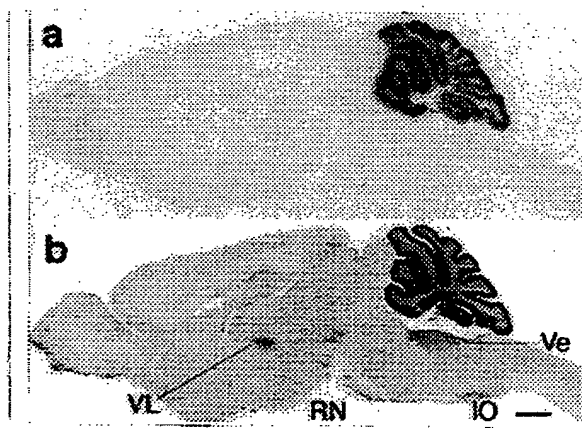


図 4

(1)

(2)



VL : 視床腹外側核

VE : 前庭神経核

RN : 赤核

IO : 下オリーブ核

図 5



図 6

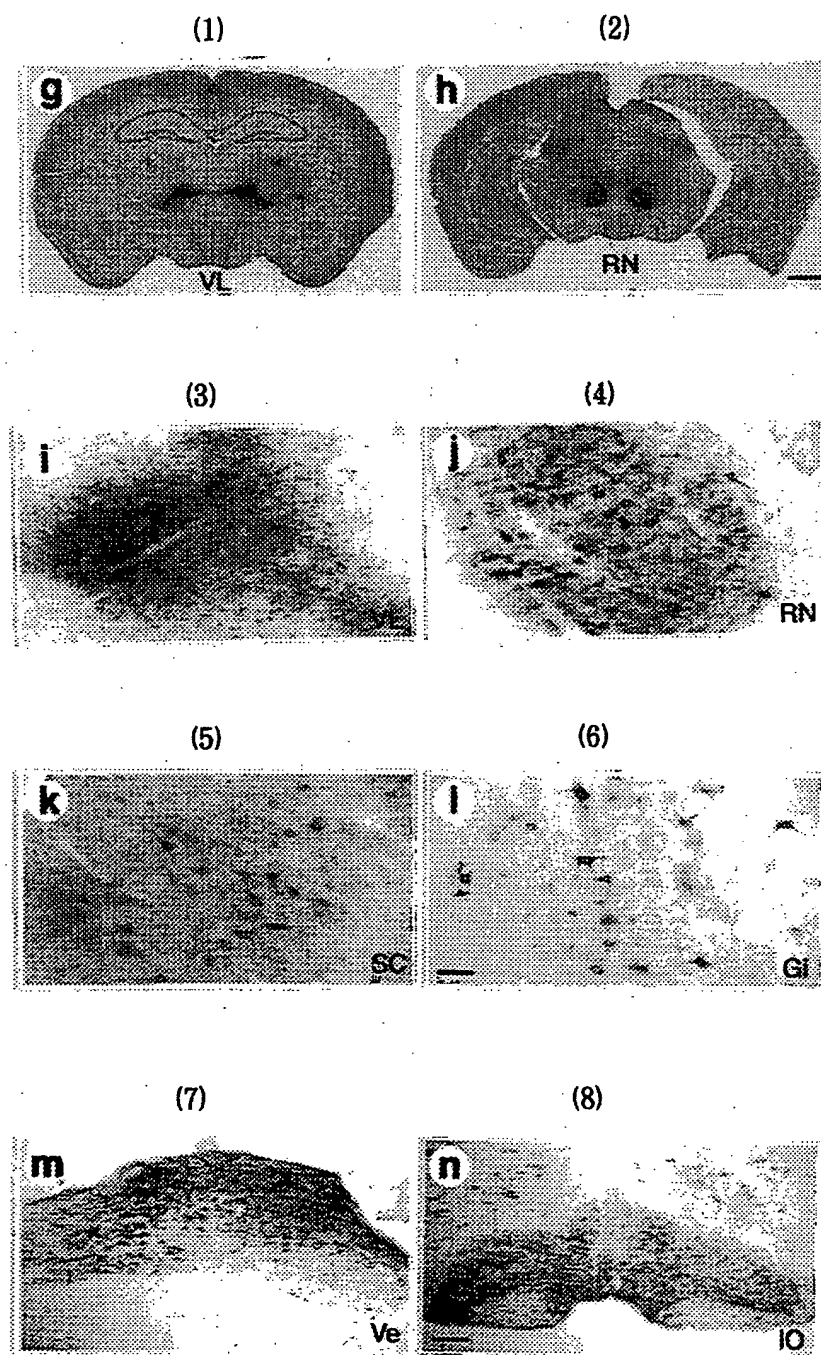
(1)

(2)

(3)



図 7



VL : 視床腹外側核

Ve : 前庭神経核

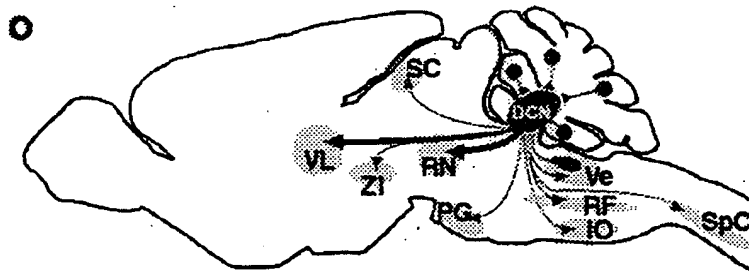
RN : 赤核

SC : 上丘

Gi : 巨大細胞性網様体

IO : 下オリーブ核

図 8



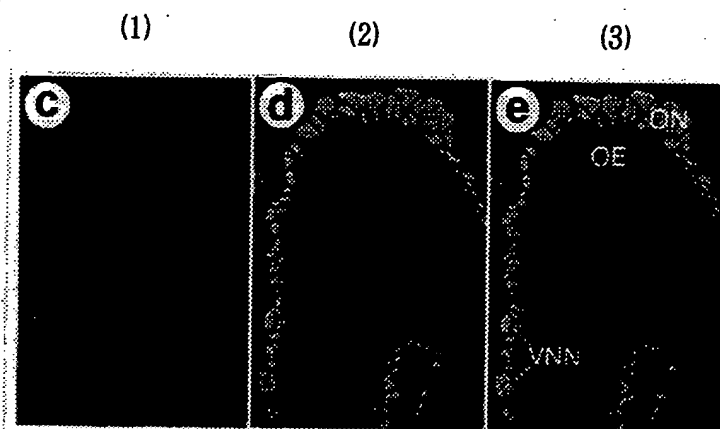
DCN : 小脳核	Ve : 前庭神経核
SC : 上丘	PG : 橋核
VL : 視床腹外側核	RF : 脳幹網様体
ZI : 不確帯	IO : 下オリーブ核
RN : 赤核	SpC : 脊髄

図 9



VNN : 鋤鼻神経束
 VNO : 鋤鼻器官
 VNE : 鋤鼻上皮

図 1 0

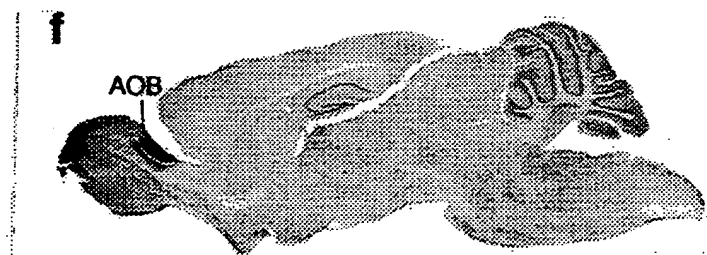


ON : 嗅神経

OE : 嗅上皮

VNN : 鋤鼻神経束

図 1 1



A O B : 副嗅球

図 1 2

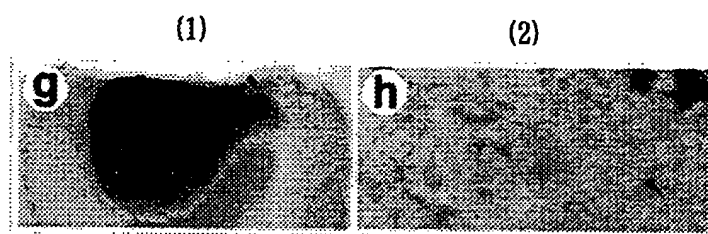


図 1 3

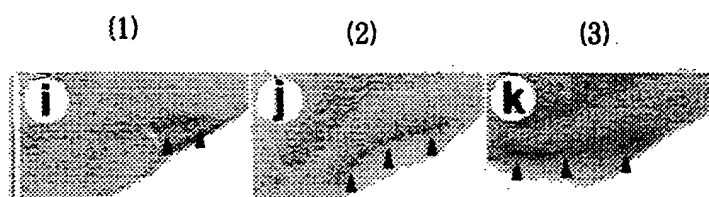
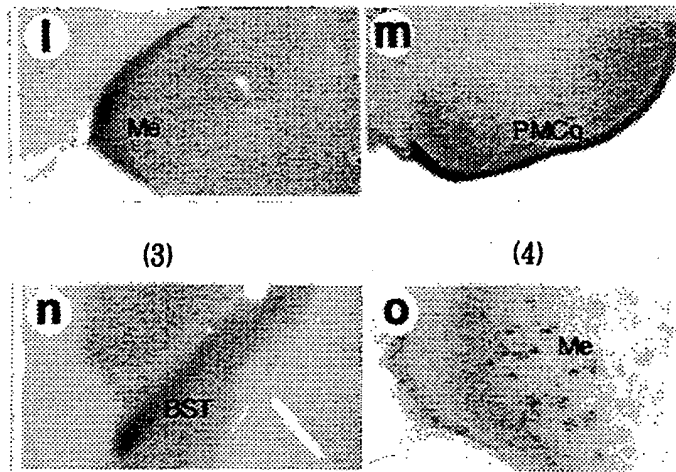


图 1 4

(1)

(2)

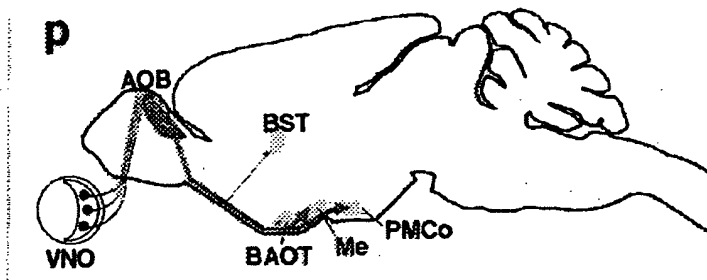


Me : 内扁桃核

PMCo : 後皮質扁桃核

BST : 分界条床核

图 1 5



AOB : 副嗅球

BST : 分界条床核

VNO : 鋤鼻器官

BAOT : 副嗅覺經路床核

Me : 内扁桃核

PMCo : 後皮質扁桃核

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISYA

<120> AN ANIMAL MODEL WITH VISIBLE NEURAL NETWORKS

<130> PH-670-PCT

<150> JP 98/232817.

<151> 1998-8-19

<160> 3

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 998

<212> DNA

<213> Triticum aestivum

accagcacca agaaaacaaa aagc atg aag atg atg agc acc agg gcc ctc 51

Met Lys Met Met Ser Thr Arg Ala Leu

1

5

gcg ctc ggc gcg gct gcc gtc ctc gcc ttc gcc gcg gcg acc gct cag 99

Ala Leu Gly Ala Ala Ala Val Leu Ala Phe Ala Ala Ala Thr Ala Gln

10

15

20

25

gcc cag agg tgc ggc gag caa ggc agc aac atg gag tgc ccc aac aac 147

Ala Gln Arg Cys Gly Glu Gln Gly Ser Asn Met Glu Cys Pro Asn Asn

30

35

40

ctc tgc tgc agc cag tac ggc tac tgc ggg atg ggc ggc gac tac tgc 195

Leu Cys Cys Ser Gln Tyr Gly Tyr Cys Gly Met Gly Gly Asp Tyr Cys
 45 50 55
 ggc aag ggc tgc cag aac ggc gcc tgc tgg acc agc aag cgc tgc ggc 243
 Gly Lys Gly Cys Gln Asn Gly Ala Cys Trp Thr Ser Lys Arg Cys Gly
 60 65 70
 agc cag gcc ggc ggc gcg acg tgc acc aac aac cag tgc tgc agc cag 291
 Ser Gln Ala Gly Gly Ala Thr Cys Thr Asn Asn Gln Cys Cys Ser Gln
 75 80 85
 tac ggg tac tgc ggc ttc ggc gcc gag tac tgc ggc gcc ggc tgc cag 339
 Tyr Gly Tyr Cys Gly Phe Gly Ala Glu Tyr Cys Gly Ala Gly Cys Gln
 90 95 100 105
 ggc ggc ccc tgc cgc gcc gac atc aag tgc ggc agc cag gcc ggc ggc 387
 Gly Gly Pro Cys Arg Ala Asp Ile Lys Cys Gly Ser Gln Ala Gly Gly
 110 115 120
 aag ctg tgc ccg aac aac ctc tgc tgc agc cag tgg gga ttc tgc ggc 435
 Lys Leu Cys Pro Asn Asn Leu Cys Cys Ser Gln Trp Gly Phe Cys Gly
 125 130 135
 ctc ggt tcc gag ttc tgc ggc ggc ggc tgc cag agc ggt gct tgc agc 483
 Leu Gly Ser Glu Phe Cys Gly Gly Gly Cys Gln Ser Gly Ala Cys Ser
 140 145 150
 acc gac aaa ccg tgc ggc aag gac gcc ggc ggc aga gtt tgc act aac 531
 Thr Asp Lys Pro Cys Gly Lys Asp Ala Gly Gly Arg Val Cys Thr Asn
 155 160 165
 aac tac tgt tgt agc aag tgg gga tcc tgt ggc atc ggc ccg ggc tat 579
 Asn Tyr Cys Cys Ser Lys Trp Gly Ser Cys Gly Ile Gly Pro Gly Tyr
 170 175 180 185
 tgc ggt gca ggc tgc cag agt ggc ggc tgc gat ggt gtc ttc gcc gag 627
 Cys Gly Ala Gly Cys Gln Ser Gly Gly Cys Asp Gly Val Phe Ala Glu
 190 195 200

gcc atc acc gcc aac tcc act ctt ctc caa gaa tgatgatcaa tcttgctatg 680

Ala Ile Thr Ala Asn Ser Thr Leu Leu Gln Glu

205

210

gcagtattgc aacgacgaat aatccgtggc aatctcatig ccacciaagg tttcccttga 740

cttactttta gagtactagt ccttaataat tctctagctt gcaatatgat gtgcaggtta 800

ctgcagcaga aacaaaatat tgctgtcgtg catgcatgga aatattgcag tgagaaagta 860

ctgtgtggca atatagggtg tgctattgtt gccgcaaatt agttttcttg ttatgacctg 920

ttgtcaggat gcatgcatgg ctgttgtaat gttggagtac ttcgtgattt cgttgcaata 980

tattacatg gttctcac 998

<210> 2

<211> 3935

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

gcttaactgg tttcctgaaa ggtatctigg agataggaac agactctcag agcatggtca 60

gaaagccaca gctcatcaat gaaatggtea gggacttcct gtcctgctcc atgcataaat 120

gaaagacgaa gacaactcaa attggcattt gaggggcaga taaacaggag catccggtag 180

tttcacaggt ggtcgggtag caggagccgg gttggttggg tggctctgtg agagtgcagg 240

gattaaggga agaggcctgg accccaactt cttccttggc taccctctg aaaatgtcac 300

ctgccttgca tggacgaact cacaggcagg aatgggttgg cttgggtggg gacatcctgc 360

aggttccacc ctcatgttgg ttcatcttca acattgtact gacttcttcc cacttgacat 420

tcctcaaggt cctgtgatca tggctgggtc tagtgagggt caaacctgca ctgccctacc 480

cacaccacaca cccagctcag cgtcagtcag gatcaacaat tacctagaga tcacttttct 540

ggggcttaag cattggtggg agcagatggg atatgagctg gggatttggg aatgggggaa 600

gatacttgcct cccctctccc ctacacccta gccttttaaa aggccttctc aggtcagaga 660

ccaggagaaa agtataggag agatacaca tggaccagga agaagaaaag ggagagggag 720

gctcagacct tctagacaag gtaagagggc tctggctgac tccaccatcc gcttcttgag 780

gtctcggcac ctgtaattga caagattaat tcatttatag ggcattctaat tagcaagcaa 840
 gtctctggag tcccctgacc cagttactat aacacacagg gggatataggt aggagagtat 900
 aagagccccct cctcagggca aatgaatgga ttcttiagtac tgtcccccaa gagatagtag 960
 gtactaggat ttaggggcac ttctgagccc catttcctg gtaagtgtcc caacccccca 1020
 aatcaacca agcctggtct caatctagga cagtggtaga atgctgtccc tagagtcagt 1080
 accatgtgaa attgtgtgc aggcaggggc cccaggtctg gaggtggggg ttgggggagt 1140
 cagggcaggt caggaagga gactcaggtt tcatttagag aaattctgca gaccctgag 1200
 gactatggtg agagcagaga tgggaaggca ggcactgttt cgggtggatg ctgtctggaa 1260
 gacaggggaag gcacagacca aactaaacca atcacgtctg tccccaaggc aggttcaccg 1320
 gaccaggaag gcttcttcaa cctgtctgacc cacgtgcagg gcgatcgg atg gag gag 1377

Met Glu Glu

1

cag cgc tgt tcc ttg cag gct ggg cca ggc cag aac cca gaa agc c 1423

Gln Arg Cys Ser Leu Gln Ala Gly Pro Gly Gln Asn Pro Glu Ser

5

10

15

gtaagcaggg cgtgattggg ccgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 1483

gtgtggcagg agtgcctggg ttctgggatc ttgtggatct tgggactcag gatggggtct 1543

gtattcatgc ctgcctgtct ctgctccaag cag ag ggt ggc cct gct cca gag 1596

Gln Gly Gly Pro Ala Pro Glu

1

5

atg gac aat ctc atg gat atg ctg gtc aac acc cag ggc cgc cgc atg 1644

Met Asp Asn Leu Met Asp Met Leu Val Asn Thr Gln Gly Arg Arg Met

10

15

20

gac gac cag cgt gta aca gtt aat tcc ctg cct ggc ttc caa cct atc 1692

Asp Asp Gln Arg Val Thr Val Asn Ser Leu Pro Gly Phe Gln Pro Ile

25

30

35

ggc ccc aag gtaggtgatg tccagattac ctgtgagact ccacatagct 1741

Gly Pro Lys

40

ctctaaatct atgacctgtc tctaggcagg aaaggagagg accctatgaa cacgtaaagt 1801
 gctatgggct taaggctcagg tggcaggact catgctagtg cagaactatg gctggaaatt 1861
 acagtctctg ctccaacatc tgtatatitg ggagaggcca caggagagaaa acaggcagtt 1921
 ttcttggaag gcataatgaat gcataccctt ataaatcaat gaagagtagg gcttctgttt 1981
 gggagtgttt tgctttatitg tttttgagac agggtttcat gtagctctgg ctggcatgtt 2041
 ctctacatg tgcattcctg gtcttgggat aacagggtgtg agtcaccatg agtgatgtat 2101
 gtgggtaggg atagaacca gggctttgat gcagtctcta tcaactgagc tccagcccca 2161
 gccctatgtc tgtgtacatt agcatacatg tttagagctc cgggcacacg tgtgcacacg 2221
 cagggtggagg ccagaagica atctctgtcc ctgggagctt tcagtgcctt ggaactccag 2281
 gtagatcagg ctctctagct aggaagccct tgggacctc ctgactctta agcactgaga 2341
 ttacaagtgc ataaaccac accctggctta aactcaggtc ttcaaatgag catagcaagg 2401
 atttcaatga ctgagctatc ttctcaactc aactgtttgt ttgtttgttt tagtatitg 2461
 ctttgaactc aaaataatcc tcttgccgtt ttcttgagta ctgggattac aggtatacac 2521
 taacaggcca atgtctgacc aaataccacc accctaatta gcagacgaaa aaaaaacatt 2581
 gtttgaggc acttctgact tgcactttcc ttggctccct ccttccgtct gaccttctt 2641
 catccccag gat gga atg cag aaa cga cct ggg acc ctc agc cct caa 2689

Asp Gly Met Gln Lys Arg Pro Gly Thr Leu Ser Pro Gln

1

5

10

ccc ctg ctc acc cct cag gat cct gct gca ctc agc ttc cgc agg aac 2737
 Pro Leu Leu Thr Pro Gln Asp Pro Ala Ala Leu Ser Phe Arg Arg Asn

15

20

25

agc agc ccc cag ccc cag aca caa gct cct tgagagtct agccatcctg 2787
 Ser Ser Pro Gln Pro Gln Thr Gln Ala Pro

30

35

ggcctccac tggccctga aaacaataaa acacttggca ctagcaacaa agagttgagt 2847
 gtgtgttatt ttctgtgtg gggaaggag ctgggacttg aggaactgaa ggtctcagga 2907
 gctctgttgg gcagcttgaa gaagtctctc ttctttctgc ttccggatct tctgcttaaa 2967
 ttcttctagc tcttggcgtt ggaatgggga aaggggtgtg atgggaagga aggaagagta 3027
 caggcctcac agcctggact cactcacact atcctccctt tggcttcaga gttcagtatc 3087

cacactggga gcccacatgcc aatcacaaac actgtacaag tgagttcagc ttcatccctc 3147
 ggggaaaagg taatatgtga caccatttgt gccctcccct cttttaaga tggggtctca 3207
 tatactacag gctagccttg agctcaccag gcggcagaga atagccagaa ttctcaatcc 3267
 tcttgcatcc atctcctgag tgctggaatg ctggaattac agcttccctc cctgtctccc 3327
 tctctctatc cccatgcagc ccaggctagc ttcaatctga tactcctcct actcctcctt 3387
 ccaagtgtcc gtaggtatac accatcacaa acaacaagaa acctttatgg agacaaggtc 3447
 tctagcccag gctagtctgg aattcctact cagtctgctg cttccacttt cctacctatg 3507
 gctgaggggtg aaatctttat tccaagccca actaggtaag agtgactcag ctccttgggg 3567
 aaaacaggtt actgacctga cctccttct ctcttggcca cagctccctc tgtggaacaa 3627
 agtcacaggt gagaacacaa ggcaggagaa tccagagccc cacatccaca acagggttga 3687
 ctcatgagag gcagacaatg gatctcaata gcaagttggt gcttcatacc ctcccttccg 3747
 caggaattat ccatcaagca ctttgatacc caccttacgc tggacaacat agtctcaaa 3807
 ccactcagcc tgattggaga tccagaacat aaccacgggg aaagtgaggt agaggacat 3867
 ctgtaaaagc agaggtgggt ggagcacagg gagattgcag ggaagcccaa aggacaggtc 3927
 cggagctc 3935

<210> 3

<211> 3279

<212> DNA

<213> Mus musculus

atctctgtct ccaccactca gaggcactca cagactccag ttctgccatc tgtccacata 60
 cactgcctgg gtccacctc ccactgacat tccctttag gtccccagct tcttccttg 120
 cctcacgtct cccatgggag gtggaggatc agtttaggcg gaatggctgg taggattttg 180
 gtggacgtga gagccaatcc tgtggctatg tggttggatc gatcaaacca cggcctctgg 240
 gagccgagcc agccgtctgt ctggcagatg atttgggati tgagagctgc aggttcagat 300
 gggaggtgac agtgggctgg gtcctgatgg tgataaagga gagggagaca ccagggcacc 360
 tgacaggacc tgacaggggc tatgacagag tggggigggg ggtgcggagg aggaggcaac 420
 catggaaagt tggcttggct gactacagaa aactgaaatg tgtgccaccg gtgctacccc 480
 gccctgccac ctcttccctg gacagtcttc ggttacctcc atgtgtctat aacctcacct 540

atctcccaac agcgctgtgg agtattccat tcttcacaaa caagcaaagc tccagcttgc 600
 cactaccact gtagtcaagg tggttgccac agcagttgat atcagtgtc tggccccag 660
 ggagcccac accctccagc ctgcctacag cacagcttta ccagttagga ggcagttgga 720
 cacacacact cctgtgtccc ctgttctgag aactgggtgg ggccagaaag gctggaaagg 780
 gaggcgggcc ttcaggtggc ctcttctctt ggcatcggag gatccagccc acttgattcc 840
 ctgacgctgg tggtagtggg ggcaagtggc atcgctgtag cacttgggcc atg gca 896

Met Ala

1

gag gat ggg ccg cag aag cag cag ctg gag atg ccg ctg gtt ctg gac 944
 Glu Asp Gly Pro Gln Lys Gln Gln Leu Glu Met Pro Leu Val Leu Asp

5

10

15

cag gac ctg acc cag cag atg cgg ctc cga gta gag agc ctg aag cag 992
 Gln Asp Leu Thr Gln Gln Met Arg Leu Arg Val Glu Ser Leu Lys Gln

20

25

30

cgt ggg gag aag aag cag gat ggt gag aag ctg atc cgg ccg gct gag 1040
 Arg Gly Glu Lys Lys Gln Asp Gly Glu Lys Leu Ile Arg Pro Ala Glu

35

40

45

50

tcc gtc tac cgc ctc gat ttc atc cag cag cag aag ctg cag ttc gat 1088
 Ser Val Tyr Arg Leu Asp Phe Ile Gln Gln Gln Lys Leu Gln Phe Asp

55

60

65

cac tgg aac gtg gtt ctg gac aag ccc ggc aag gtc acc atc acg ggc 1136
 His Trp Asn Val Val Leu Asp Lys Pro Gly Lys Val Thr Ile Thr Gly

70

75

80

acc tcg cag aac tgg acg ccc gac ctc acc aac ctc atg aca cgc cag 1184
 Thr Ser Gln Asn Trp Thr Pro Asp Leu Thr Asn Leu Met Thr Arg Gln

85

90

95

ctg ctg gac ccc gcc gcc atc ttc tgg cgc aag gaa gac tcc gac gcc 1232
 Leu Leu Asp Pro Ala Ala Ile Phe Trp Arg Lys Glu Asp Ser Asp Ala

100

105

110

atg gat tgg aat gag gca gac gcc ctg gag ttt ggg gag cgc ctt tct 1280
 Met Asp Trp Asn Glu Ala Asp Ala Leu Glu Phe Gly Glu Arg Leu Ser
 115 120 125 130
 gat ctg gcc aag atc cgc aag gtc atg tat ttc ctc atc acc ttt ggc 1328
 Asp Leu Ala Lys Ile Arg Lys Val Met Tyr Phe Leu Ile Thr Phe Gly
 135 140 145
 gag ggc gtg gag cct gcc aac cta aag gcc tct gtg gtg ttt aac cag 1376
 Glu Gly Val Glu Pro Ala Asn Leu Lys Ala Ser Val Val Phe Asn Gln
 150 155 160
 ctc tgatgacagc cctggctgcc ctaccctgg cccacacctct cccttgccctg 1429
 Leu
 gatctccttc ctcatgtgta tttgggggac attcttctag ctgctcctcc tgtgctcacc 1489
 ttggccagag ttccccgag tgctacatcc cctccttttc cctgggtgcca gtgctgcggc 1549
 tcacagtgat gtcccatggc tccgtagtct agatctagaa gccggatgct gctactatag 1609
 actgtagagg ctttttgggt ccacgtggga agatggatgg gccccctgtg gtgaagagcg 1669
 ggactgagag ataaagagac tgaccaagag atgcaaacgg ccagcactga ttcctccctt 1729
 cagggacggg agactgagac tggacaggaa caccttccgg ggaacctggc aagaaggcgt 1789
 ttgccctgct ggccaaagct ggagccagga ggccaatgcc cagcctctgg cagcaggaag 1849
 gtctcctcc cagtgtcggc agcagccgc tgtgacctta gggccttcaa gacactgggc 1909
 aggatgacag cggggcttga tctgactgct tttccaggtc tgggccttgt ttttatggag 1969
 aagtgagaga gtgtgtagaa actgaaacaa ctctagccac ccacgctcat atgggtattg 2029
 agagatggca taactatttg tatggatgtg ggctgaggg ctagtcttgg tgaggagtaa 2089
 ggctaacttt agtttaatta ttgagctggt actggcttgt gggcttggtg gaggtgatcc 2149
 tgactgaggc gtccttggtg cagtgccttt tgaactggga gactgagact cgaatggtgt 2209
 agcagagtta gaggggtcca gggctctgag ctagcaacag tgatgtccct gttaggaagg 2269
 ctggcatttg ctgctcgtg gtgttgtgcc ctgctgtcac cccctgggc atatcctggc 2329
 tgttctctg gactgcagac ccctaagtaa ggcttgggtg ggggcagtta ggatgcciga 2389
 cgtctgaagt gggctggagc tatctgactg tgatgccaa actgacagga aaacggtggc 2449
 acagttagca ggttcagctc taccceaagt ctcatgtcc ctgccttgc acatcctgaa 2509

agccttccat tgcctgttac ctagcatcag ccagaggtag ctcagcagtg tcccctgact 2569
gtctcaaggc tgcctccctc gggcatactg aaggtaggat ctgtcccagc tggtagctg 2629
ccaggactgc aaaccccagc tcaggtgcag gattctggag gcaggagata ggctgtggta 2689
ccggtgtctc ttgagccggt gcctctgctc cataacatgc ttgccgaagc actggccggt 2749
gcttctggat tctgtgact ctaggagacc acaccagac agtgcctctg ctttctgt 2809
tcttctctg acctctccct acagctttag agacccctt gggtcacact gcctgtgcc 2869
caactctgcc tcaactggat ccgtctgcc tgtggggaca tgagtgtctc tgttgtcct 2929
gtttcacaat aaagactgtg tgccctcccc tctgtggtgt ggtgtgtgt cctccgtgt 2989
gtggtttgca catctgtctg caagcccata gcatcagaat cttctctca tgggccctgt 3049
agctctgagc aactccaccc tgccagcctt gaggatgagg ccgagtcgtg agatctctca 3109
tgaggattga gtttcacctg tcagccaggt ttcttggtc cctgcaggt accaatcctc 3169
tagggtatga aagagcatgc taaagctatg cttggggcag gggagtgtag cgggtaggac 3229
tgatactaatttagcttgggt cttgggtcact gtttggtgt gccctctaga 3279

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04439

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ A01K67/027, G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ A01K67/027, G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DIALOG (BIOSIS)

DIALOG (WPI/L)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	International Journal of Development Neuroscience Vol.14 No.7/8 813-822 (1996)	1-4
A	Experimental Brain Research Vol.63 No.3 461-473 (1986)	1-4
P,X P,A	Neuron Vol.22 No.1 33-41 (1991)	1-3 4,5
X	Ed. Yodosha, Experimental Medicine extra issue, BioScience Terminology, Cranial nerve, Katsuhiko Mikoshiba (issued on 20 July, 1998 2 nd issue)	5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 November, 1999 (15.11.99)

Date of mailing of the international search report
24 November, 1999 (24.11.99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁶ A01K67/027, G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁶ A01K67/027, G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
DIALOG (BIOSIS) DIALOG (WPI/L)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	International Journal of Development Neuroscience Vol.14 No.7/8 813-822 (1996)	1-4
A	Experimental Brain Research Vol.63 No.3 461-473 (1986)	1-4
P, X P, A	Neuron Vol.22 No.1 33-41 (1991)	1-3 4, 5
X	羊土社刊 実験医学別冊 BioScience用語ライブラリー 脳神経 御子栄克彦 編 (1998年7月20日第2刷発行)	5
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 15.11.99	国際調査報告の発送日 24.11.99	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 坂田 誠 電話番号 03-3581-1101 内線 3237	2B 2914 印

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINE(S) OR MARK(S) ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.